

Ocena jakościowa występowania grzybów z rodzaju *Malassezia* na skórze u pacjentów z łuszczycą zwyczajną

Distribution of *Malassezia* species in patients with psoriasis – quality assessment

Elżbieta Rup¹, Magdalena Skóra², Paweł Krzyściak², Anna B. Macura²

¹Klinika Dermatologii Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medium w Krakowie,
kierownik Kliniki: prof. dr hab. n. med. Anna Wojas-Pelc

²Zakład Mykologii Katedry Mikrobiologii Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie,
kierownik Zakładu: prof. dr hab. n. med. Anna B. Macura

Post Dermatol Alergol 2010; XXVII, 4: 264–268

Streszczenie

Wprowadzenie: Grzyby z rodzaju *Malassezia* są składnikiem mikrobioty skóry ludzi i niektórych zwierząt. Grzyby te w momencie zaistnienia odpowiednich czynników predysponujących mogą być przyczyną chorób skórnych lub nawet zakażeń narządowych i uogólnionych.

Cel pracy: Ocena częstości występowania grzybów z rodzaju *Malassezia* na skórze pacjentów z łuszczycą zwyczajną oraz określenie zależności między występowaniem *Malassezia* a stopniem zaawansowania zmian skórnych, a także wiekiem i płcią pacjenta.

Materiał i metody: Materiałem do badań były wymazy ze skóry pobierane z czterech lokalizacji ciała: owłosionej skóry głowy, twarzy, klatki piersiowej i pleców. Grzyby *Malassezia* sp. izolowano w hodowlach na zmodyfikowanym podłożu Dixona i identyfikowano na podstawie cech morfologicznych i biochemicznych.

Wyniki: *Malassezia* sp. wyizolowano od 57,7% badanych pacjentów. Grzyby te najczęściej (37,3% przypadków) uzyskiwano z klatki piersiowej, najrzadziej (9,8% przypadków) z owłosionej skóry głowy. Z pleców i twarzy *Malassezia* sp. izolowano z porównywalną częstością – odpowiednio 27,5% i 25,5%.

Wnioski: Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w częstości izolacji *Malassezia* między mężczyznami a kobietami. Nie zaobserwowano różnic w występowaniu *Malassezia* w zależności od wieku pacjentów. W grupie pacjentów, od których izolowano *Malassezia* sp., stwierdzono większe wartości PASI (*psoriasis area and severity index*) oraz większe wartości powierzchni ciała.

Słowa kluczowe: *Malassezia* sp., łuszczyca, choroby skóry.

Abstract

Introduction: The fungi *Malassezia* are a constituent of the skin microbiota in humans and some animals. The fungi may cause skin diseases or even organ and/or generalized infections in the presence of appropriate predisposing factors.

Aim: To evaluate the occurrence of *Malassezia* fungi on the skin in patients with psoriasis and to search for a relationship between the occurrence of *Malassezia* and the severity of skin lesions as well as the age and sex of the patients.

Material and methods: The materials comprised smears sampled from four sites: scalp, face, chest and back. *Malassezia* spp. were isolated in cultures on modified Dixon medium and identified on the basis of morphological and biochemical features.

Results: *Malassezia* spp. were isolated in 57.7% of the patients. The fungi were most prevalent on the chest (37.3%) and least on the scalp (9.8%). The prevalence on the back and face was comparable, 27.5% and 25.5% respectively.

Conclusions: No statistically significant differences were found between *Malassezia* prevalence in males vs. females. No relationship with the patients' age was found. Higher values of the psoriasis area and severity index (PASI), and of the body surface area (BSA) were found in the patients in whom *Malassezia* spp. were isolated.

Key words: *Malassezia* spp., psoriasis, skin diseases.

Adres do korespondencji: prof. dr hab. n. med. Anna B. Macura, Zakład Mykologii Katedry Mikrobiologii Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie, ul. Czysza 18, 31-121 Kraków, tel. +48 12 633 08 77, wew. 231, e-mail: mbmacura@cyf-kr.edu.pl

Wprowadzenie

Grzyby z rodzaju *Malassezia* należą do oportunistów o istotnym znaczeniu klinicznym u ludzi i niektórych zwierząt. Mogą być izolowane ze zdrowej skóry oraz powodować pewne choroby dermatologiczne, a w przypadku znacznego obniżenia odporności mogą się także przyczyniać do wystąpienia zakażeń ogólnoustrojowych. Do najczęściej występujących dermatoz związanych z zakażeniem grzybami z rodzaju *Malassezia* u ludzi należą łupież pstry (*pityriasis versicolor*) i zapalenie mieszków włosowych (*Malassezia folliculitis*). Grzyby z rodzaju *Malassezia* mogą również nasilać zmiany chorobowe w takich schorzeniach, jak łojotokowe zapalenie skóry i trądzik pospolity, oraz zaostrzać przebieg łuszczycy i atopowego zapalenia skóry [1–6]. Częstość powierzchownych zakażeń grzybiczych wywołanych przez grzyby z rodzaju *Malassezia* zależy od wielu czynników, w tym od warunków socjoekonomicznych, klimatycznych czy geograficznych. Dzięki badaniom biologii molekularnej zidentyfikowano obecnie 13 gatunków *Malassezia*, w tym 12 lipidozależnych (*M. furfur*, *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. sympodialis*, *M. slooffiae*, *M. nana*, *M. dermatis*, *M. restricta*, *M. equina*, *M. japonica*, *M. yamatoensis* i *M. caprae*) oraz 1 lipidoniezależny (*M. pachydermatis*) [1, 6–9].

Łuszczyca (*psoriasis*) jest jedną z najczęściej występujących genetycznie uwarunkowanych chorób skóry. Szacuje się, że ok. 1–5% populacji europejskiej choruje z powodu łuszczycy. Patogeneza tej choroby nie jest do końca poznana. Istnieje wiele czynników predysponujących do wystąpienia łuszczycy. Zalicza się do nich czynniki genetyczne (antygeny układu HLA: HLA-A2, HLA-B13, HLA-B17, HLA-B27, HLA-Bw57, HLA-Cw2, HLA-Cw6, HLA-DR7), immunologiczne oraz środowiskowe (uraz, światło, infekcje) [10, 11]. Zakażenia zarówno systemowe, jak i miejscowe wywołane przez paciorkowce β -hemolizujące czy grzyby z rodzaju *Candida* są znanym czynnikiem inicjującym epizod łuszczycy wysiewnej i zaostrzającym przebieg łuszczycy plackowatej. W wielu badaniach wykazano, że stymulacja leukocytów jednojądrzastych krwi obwodowej pacjentów z łuszczycą przez superantygeny paciorkowców grupy A wiązała się ze znacznie zwiększoną odpowiedzią proliferacyjną oraz uwalnianiem cytokin prozapalnych przez leukocyty [12]. W badaniu przeprowadzonym przez Okubo i wsp. zaobserwowano zwiększoną ekspresję bakteryjnego 16S rybosomalnego RNA (rRNA) oraz grzybiczego 18S rRNA w monocytach krwi obwodowej pacjentów z łuszczycą, świadczącą o nadmiernej aktywacji monocytów przez drobnoustroje u tych osób [13].

Cel pracy

Ocena częstości występowania grzybów z rodzaju *Malassezia* na skórze pacjentów z łuszczycą zwyczajną oraz określenie zależności między występowaniem *Malas-*

sezia a stopniem zaawansowania zmian skórnych oraz wiekiem i płcią pacjenta.

Materiał i metody

Grupa badana

Grupę badaną stanowili pacjenci obu płci, powyżej 18. roku życia, u których rozpoznano łuszczycę zwyczajną. Nasilenie zmian łuszczycowych określano wskaźnikami PASI (*psoriasis area and severity index*) i powierzchni ciała (*body surface area* – BSA).

Izolacja i identyfikacja *Malassezia* sp.

Od każdego pacjenta pobierano za pomocą jałowych wymazówek zwilżonych w soli fizjologicznej materiały do badań mikologicznych w postaci czterech wymazów z okolic skóry bogatych w gruczoły łojowe:

- z owłosionej skóry głowy,
- z twarzy (bruzd nosowo-wargowych i czoła),
- z klatki piersiowej (okolice mostkowej),
- z pleców (okolice międzyłopatkowej).

Wymazy były pobierane zarówno ze skóry chorobowo zmienionej, jak i zdrowej. Materiały kliniczne posiewano na zmodyfikowane podłoże Dixona o składzie: ekstrakt słodowy 36 g, pepton 6 g, żółć wołowa 20 g, Tween 40 10 ml, glicerol 2 ml, kwas oleinowy 2 ml, chloramfenikol 250 mg, agar 12 g i woda destylowana 1000 ml. Hodowlę prowadzono w temperaturze 30°C przez 10 dni. Grzyby *Malassezia* sp. identyfikowano do poziomu rodzaju na podstawie morfologii kolonii, wyglądu mikroskopowego komórek grzyba w preparatach z hodowli, badając zdolność do wzrostu bez dodatku związków lipidowych oraz wykonując próbę na ureazę na stałym podłożu Christensena z dodatkiem Tween 40 i Tween 80.

Analiza statystyczna

Zebrane dane opracowano przy użyciu języka i środowiska do obliczeń statystycznych R w wersji 2.9.1 (2009 r.).

Wyniki

Wyniki badania przedstawiono w tab. 1. i na ryc. 1., 2. Badaniu poddano łącznie 52 pacjentów z łuszczycą w wieku 20–74 lat, w tym 20 kobiet i 32 mężczyzn.

Malassezia sp. wyizolowano od 30 badanych pacjentów (57,7%). Częstość izolacji grzybów tego rodzaju u kobiet wyniosła 50,0% (10 pacjentek), a u mężczyzn 62,5% (20 pacjentów). Łącznie z różnych lokalizacji wyizolowano 51 izolatów *Malassezia* sp. – 18 izolatów od kobiet i 33 izolaty od mężczyzn. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic dotyczących częstości izolacji *Malassezia* między mężczyznami a kobietami (test χ^2 , $p = 0,3747$).

Tab. 1. Charakterystyka badanej grupy pacjentów

Płeć	Liczba	Wiek $\bar{x} \pm SD$	Liczba izolacji <i>Malassezia</i> sp. z poszczególnych lokalizacji				PASI $\bar{x} \pm SD$ (Me)	BSA [%] $\bar{x} \pm SD$ (Me)
			głowa	twarz	klatka piersiowa	plecy		
K	20	39 \pm 13	1	4	7	6	7,5 \pm 4,8 (6,6)	16,8 \pm 12,2 (10,0)
M	32	47 \pm 14	4	9	12	8	10,5 \pm 5,4 (10,5)	28,3 \pm 16,6 (30,0)
razem	52	44 \pm 14	5	13	19	14	9,4 \pm 5,3 (10,0)	23,8 \pm 16,0 (22,5)

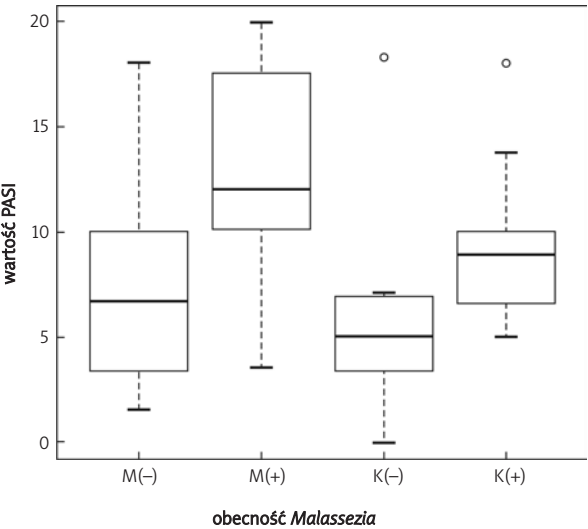
K – kobiety, M – mężczyźni, $\bar{x} \pm SD$ – średnia arytmetyczna \pm odchylenie standardowe, Me – mediana

Grzyby z rodzaju *Malassezia* najczęściej izolowano z klatki piersiowej. Łącznie z tego miejsca uzyskano 19 izolatów, co stanowiło 37,3% ogółu przypadków izolacji *Malassezia* (7 izolatów od kobiet – 38,9%, i 12 izolatów od mężczyzn – 36,4%). Najrzadziej *Malassezia* sp. izolowano z owłosionej skóry głowy (5 izolatów – 9,8%), dotyczyło to zarówno kobiet, jak i mężczyzn (1 izolát od kobiet – 5,6%, i 4 izolaty od mężczyzn – 12,1%). Z pleców i twarzy *Malassezia* sp. izolowano z porównywalną częstością 27,5% i 25,5% – odpowiednio 33,3% (6 izolatów) i 22,2% (4 izolaty) od kobiet oraz 24,2% (8 izolatów) i 27,3% (9 izolatów) od mężczyzn. W przypadku połowy badanych pacjentów, u których stwierdzono występowanie *Malassezia* sp. (50% kobiet i 55% mężczyzn), grzyby te izolowano tylko z jednego miejsca ciała. *Malassezia* sp. uzyskiwano jednocześnie z 2 i 3 lokalizacji ciała z częstością 20% i 30% od kobiet oraz 25% i 20% od mężczyzn. Nie izolo-

wano *Malassezia* sp. jednocześnie z 4 badanych miejsc ciała. W badaniu nie zaobserwowano różnic dotyczących częstości izolacji *Malassezia* między skórą zdrową i chorobowo zmienioną. W badaniu nie odnotowano różnic dotyczących występowania *Malassezia* w zależności od wieku pacjentów (test U Manna-Whitneya, $p = 0,7456$).

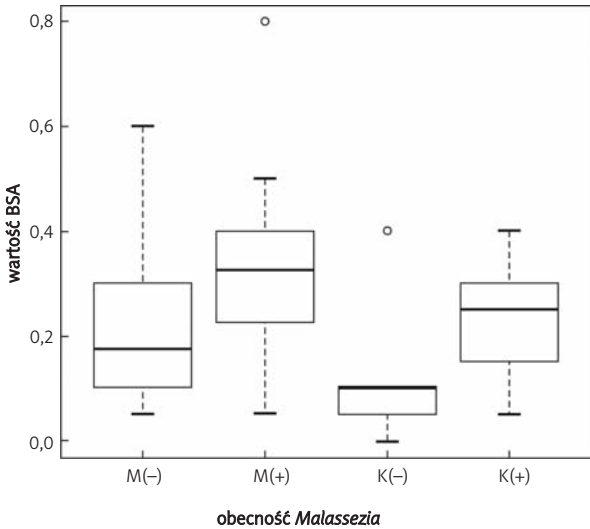
Nasilenie zmian tuszczycowych wyrażone wskaźnikiem PASI mieściło się w przedziale 1,8–20, średnio wynosiło 9,4. Większe wartości PASI stwierdzano w grupie pacjentów, od których izolowano *Malassezia* (test U Manna-Whitneya, $p < 0,001$). Nie zaobserwowano różnic w wartościach PASI w zależności od płci.

Rozległość zmian skórnych określona wskaźnikiem BSA u badanych pacjentów zawierała się w przedziale 5–70%, średnia wynosiła 23,8%. W grupie pacjentów z *Malassezia* obserwowano większe wartości BSA (test U Manna-Whitneya, $p = 0,003462$). Obecność *Malassezia*



M(-)/K(-) – mężczyźni/kobiety bez stwierdzonej obecności *Malassezia*, M(+)/K(+) – mężczyźni/kobiety skolonizowani przez *Malassezia*; poziomą kreską zaznaczono medianę, ramką – 1–3. kwartył, wąsami – zakres wartości, kółkiem – wartości odstające

Ryc. 1. Porównanie wartości PASI u pacjentów skolonizowanych szczepami *Malassezia* i bez stwierdzonej kolonizacji



M(-)/K(-) – mężczyźni/kobiety bez stwierdzonej obecności *Malassezia*, M(+)/K(+) – mężczyźni/kobiety skolonizowani przez *Malassezia*; poziomą kreską zaznaczono medianę, ramką – 1–3. kwartył, wąsami – zakres wartości, kółkiem – wartości odstające

Ryc. 2. Porównanie wartości BSA (wyrażonej w ułamku dziesiętnym) u pacjentów skolonizowanych szczepami *Malassezia* i bez stwierdzonej kolonizacji

nie miała wpływu na wartości BSA w badanej grupie mężczyzn (test *t*-Studenta, $p = 0,08142$), natomiast kobiety, od których izolowano *Malassezia*, wykazywały istotnie statystycznie większe wartości BSA (test U Manna-Whitneya, $p = 0,01776$).

Omówienie wyników

Wiele badań klinicznych i przedklinicznych potwierdza udział grzybów z rodzaju *Malassezia* w rozwoju zmian łuszczycowych. Wysiew grudek łuszczycowych w miejscach aplikacji ekstraktów zawierających komórki *Malassezia* obserwowano zarówno u ludzi, jak i w badaniach przeprowadzonych na zwierzętach [14, 15]. W badaniach klinicznych wykazano również zmniejszenie nasilenia łuszczycy po zastosowaniu doustnych i miejscowych leków przeciwgrzybiczych (bifonazol, ketokonazol) [16, 17]. Obecnie uważa się, że grzyby z rodzaju *Malassezia* mogą zaostrzać przebieg łuszczycy wskutek uwalniania cytokin prozapalnych, zwłaszcza interleukiny 8, dzięki aktywacji tzw. receptorów żetonowych (*toll-like receptor*) typu II [18]. W następstwie inkubacji keratynocytów z grzybami z rodzaju *Malassezia* obserwowano również zwiększoną ekspresję TGF- β 1 oraz białek szoku cieplnego – HSP70, w keratynocytach [19]. Do innych mechanizmów mogących uczestniczyć w indukcji zmian skórnych należą: aktywacja układu dopełniacza, chemotaksja neutrofilów oraz zwiększona migracja innych komórek immunologicznych do skóry pod wpływem infekcji *Malassezia* [20, 21]. Wysoka aktywność enzymatyczna grzybów z rodzaju *Malassezia*, w szczególności produkcja lipaz, może stanowić mechanizm spustowy inicjujący proces zapalny w skórze pod wpływem aktywacji kaskady kwasu arachidonowego. Do innych istotnych w aktywacji stanu zapalnego enzymów produkowanych przez *Malassezia* należą lipooksygenaza oraz lipoperoxydaza. Utlenianie wolnych i zestryfikowanych kwasów tłuszczowych błon komórkowych przez wymienione enzymy powoduje uszkodzenie komórek i rozwój procesu zapalnego [22].

Przedstawiana w piśmiennictwie częstość kolonizacji skóry przez grzyby z rodzaju *Malassezia* u pacjentów z łuszczycą wynosi 50–90%. Różnice te wynikają głównie z zastosowanej metody badawczej. W badaniach autorów niniejszej pracy grzyby z rodzaju *Malassezia* izolowano od 57,7% pacjentów z łuszczycą, najczęściej (37,3%) z okolicy klatki piersiowej. Podobne wyniki uzyskali Zomorodian i wsp. [23] oraz Gupta i wsp. [2]. U 27,5% pacjentów z łuszczycą stwierdzono kolonizację przez *Malassezia* sp. okolicy międzyopatkowej, a u 25,5% badanych kolonizację skóry twarzy. Pozytywne wyniki hodowli najrzadziej uzyskiwano z wymazów pobranych z owłosionej skóry głowy (9,8%), co może wynikać z częstego stosowania przez pacjentów dostępnych bez recepty szamponów przeciwłupieżowych. Zaobserwowano większe nasilenie łuszczycy określane wg PASI u pacjentów z kolonizacją skóry przez *Malassezia*. W grupie mężczyzn nie stwierdzono istotne-

go wpływu kolonizacji grzybami *Malassezia* na wartości wskaźnika BSA, natomiast w grupie kobiet izolacji *Malassezia* towarzyszyły większe wartości tego wskaźnika. Znacząco częstsza izolacja grzybów z rodzaju *Malassezia* u pacjentów z większym nasileniem zmian skórnych może potwierdzać udział tych grzybów w rozwoju zmian łuszczycowych i zaostrzaniu przebiegu łuszczycy. W badaniu nie zaobserwowano natomiast zależności między częstością izolacji *Malassezia* i wiekiem oraz płcią pacjentów.

Do najczęściej izolowanych gatunków *Malassezia* u pacjentów z łuszczycą należą *M. furfur*, *M. restricta* oraz *M. globosa*. Większa aktywność enzymatyczna *M. furfur* w porównaniu z innymi gatunkami *Malassezia* może dodatkowo nasilać przebieg łuszczycy w związku z aktywacją kaskady kwasu arachidonowego [23, 24]. Charakterystyka gatunkowa oraz enzymatyczna izolowanych szczepów będzie przedmiotem dalszych badań prowadzonych w Zakładzie Mykologii.

Praca została wykonana w Zakładzie Mykologii Katedry Mikrobiologii Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie.

Piśmiennictwo

1. Dworecka-Kaszak B, Adamski Z. Zakażenia grzybami z rodzaju *Malassezia*. Wydawnictwo SGGW, Warszawa 2005; 61-114.
2. Gupta AK, Batra R, Bluhm R, et al. Skin diseases associated with *Malassezia* species. *J Am Acad Dermatol* 2004; 51: 785-98.
3. Diaz MR, Boekhout T, Theelen B, et al. Microcoding and flow cytometry as a high-throughput fungal identification system for *Malassezia* species. *J Med Microbiol* 2006; 55: 1197-209.
4. Batra R, Boekhout T, Guého E, et al. *Malassezia* Baillon, emerging clinical yeasts. *FEMS Yeast Res* 2005; 5: 1101-13.
5. Ashbee HR. Recent developments in the immunology and biology of *Malassezia* species. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2006; 47: 14-23.
6. Cabanes FJ, Theelen B, Castellá G, Boekhout T. Two new lipid-dependent *Malassezia* species from domestic animals. *FEMS Yeast Res* 2007; 7: 1064-76.
7. Hirai A, Kano R, Makimura K, et al. *Malassezia nana* sp. nov., a novel lipid-dependent yeast species isolated from animals. *Int J Syst Evol Microbiol* 2004; 54: 623-7.
8. Sugita T, Takashima M, Kodama M, et al. Description of a new yeast species, *Malassezia japonica*, and its detection in patients with atopic dermatitis and healthy subjects. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 4695-9.
9. Sugita T, Tajima M, Takashima M, et al. A new yeast, *Malassezia yamatoensis*, isolated from a patient with seborrheic dermatitis, and its distribution in patients and healthy subjects. *Microbiol Immunol* 2004; 48: 579-83.
10. Jabłońska S, Majewski S. Choroby skóry i choroby przenoszone drogą płciową. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2005.
11. Braun-Falco O, Plewig G, Wolff H, Burgdorf W. Erythematopapulo-squamous diseases. In: *Dermatology*. Ed. 2. Springer Verlag, Berlin 2000; 585-608.
12. Baker BS, Bokth S, Powles AV, et al. Group A streptococcal antigen – specific T lymphocytes in guttae psoriatics lesion. *Br J Dermatol* 1993; 128: 493-9.

13. Okubo Y, Oki N, Takeda H, et al. Increased microorganisms DNA levels in peripheral blood monocytes from psoriatic patients using PCR with universal ribosomal RNA primers. *J Dermatol* 2002; 29: 547-55.
14. Lober CW, Belew PW, Rosenberg EW, Bale G. Patch test with killed sonicated microflora in patients with psoriasis. *Arch Dermatol* 1982; 118: 322-5.
15. Rosenberg EW, Belew PW, Bale G. Effect of topical applications of heavy suspensions of killed *Malassezia ovalis* on rabbit skin. *Mycopathologia* 1980; 72: 147-54.
16. Farr PM, Krause LB, Marks JM, Shuster S. Response of scalp psoriasis to oral ketoconazole. *Lancet* 1985; 2: 921-2.
17. Alford RH, Vire CG, Cartwright BB, King LE. Ketoconazole's inhibition of fungal antigen-induced thymidine uptake by lymphocytes from patients with psoriasis. *Am J Med Sci* 1986; 291: 75-80.
18. Baroni A, Orlando M, Donnarumma G, et al. Toll-like receptor 2 (TLR2) mediates intracellular signaling in human keratinocytes in response to *Malassezia furfur*. *Arch Dermatol Res* 2006; 297: 280-8.
19. Baroni A, Paoletti I, Ruocco E, et al. Possible role of *Malassezia furfur* in psoriasis: modulation of TGF-beta1, integrin and HSP70 expression in human keratinocytes and in the skin of psoriasis affected patients. *J Cutan Pathol* 2004; 31: 35-42.
20. Bunse T, Mahrle G. Soluble *Pityrosporum* – derived chemo-attractant for polymorphonuclear leukocytes of psoriatic patients. *Acta Derm Venerol* 1996; 76: 10-2.
21. Mohla G, Brodell RT. Koebner phenomenon in psoriasis. A common response to skin trauma. *Postgrad Med* 1999; 106: 39-40.
22. Zawirska A. Grzyby z rodzaju *Malassezia*. Nowe informacje. *Post Dermatol Alergol* 2004; 2: 97-103.
23. Zomorodian K, Mirhendi H, Tarazooie B, et al. Distribution of *Malassezia* species in patients with psoriasis and healthy individuals in Tehran, Iran. *J Cutan Pathol* 2008; 35: 1027-31.
24. Mancianti F, Rum A, Nardoni S, Corazza M. Extracellular enzymatic activity of *Malassezia* spp. isolates. *Mycopathologia* 2001; 149: 131-5.